

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2000-55920
(P2000-55920A)

(43)公開日 平成12年2月25日(2000.2.25)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード*(参考)
G 0 1 N 33/543	5 9 5 5 2 1	G 0 1 N 33/543	5 9 5 5 2 1

審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 8 頁)

(21)出願番号 特願平10-221322

(22)出願日 平成10年8月5日(1998.8.5)

(71)出願人 000005108

株式会社日立製作所
東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72)発明者 竹井 弘之

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会
社日立製作所基礎研究所内

(72)発明者 坂本 健

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会
社日立製作所基礎研究所内

(74)代理人 100068504

弁理士 小川 勝男

(54)【発明の名称】 生化学センサおよびこれを利用する生化学検出装置

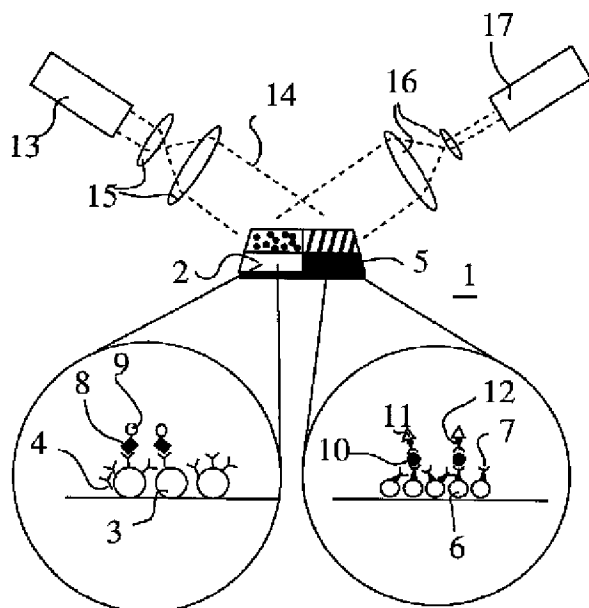
(57)【要約】

【課題】 高感度なセンサアレー及び測定装置を提供する。

【解決手段】 基板1が複数の領域に分割されており、それぞれの領域では異なる生体分子で修飾されているポリスチレン微粒子が一層吸着されている。サンプル中の被検体を蛍光色素で修飾し、サンプルを基板1に加えると抗体4に対して特異的結合能を有する被検体である蛋白質8がポリスチレン微粒子3に吸着し、蛍光色素9が領域2に結合する。励起光14の照射により、蛍光色素9もしくは前記蛍光色素11が励起されて発する蛍光信号を光学系16を介しカメラ17でモニタする。

【効果】 複数の被検体を同時に検出するセンサアレーを簡便に構成できる。

図 1



【特許請求の範囲】

【請求項1】抗体、抗原、一本鎖DNA、レセプタ、リガンド、および酵素の少なくとも一つを含む試薬で修飾された粒径5 nmから100 μ mの高分子の微粒子が平坦な基板上の区分された領域に固相化されたことを特徴とする生化学センサ。

【請求項2】前記高分子の微粒子が基板表面に施された金、銀、銅、白金、アルミなどの金属薄膜を介して基板上に固相化された請求項1記載の生化学センサ。

【請求項3】前記高分子の微粒子の基板表面と離れた側にある表面に金、銀、銅、白金、アルミなどの自由電子金属薄膜が施された請求項1または2記載の生化学センサ。

【請求項4】抗体、抗原、一本鎖DNA、レセプタ、リガンド、および酵素の少なくとも一つを含む試薬で修飾された粒径1 nmから100 μ mの金微粒子が平坦な基板上の区分された領域に固相化されたことを特徴とする生化学センサ。

【請求項5】平行化白色光を照射する光学系、前記平行化白色光を所定の角度で照射される生化学センサ、該生化学センサから反射される光を検出する光学系および検出された光のスペクトルを測定する計測手段よりなり、前記生化学センサにおいて粒径5 nmから100 μ mの高分子の微粒子が平坦な基板上の区分された領域に固相化され、前記高分子の微粒子の基板表面と離れた側にある表面に施された金、銀、銅、白金などの自由電子金属の薄膜が抗体、抗原、一本鎖DNA、レセプタ、リガンド、および酵素の少なくとも一つを含む試薬で修飾されたものであることを特徴とする生化学検出装置。

【請求項6】平行化単色光を照射する光学系、前記平行化単色光を所定の角度で照射される生化学センサ、該生化学センサから反射される光を検出する光学系および検出された光の強度を測定する計測手段よりなり、前記生化学センサにおいて粒径5 nmから100 μ mの高分子の微粒子が平坦な基板上の区分された領域に固相化され、前記高分子の微粒子の基板表面と離れた側にある表面に施された金、銀、銅、または白金の自由電子金属の薄膜が抗体、抗原、一本鎖DNA、レセプタ、リガンド、および酵素の少なくとも一つを含む試薬で修飾されたものであることを特徴とする生化学検出装置。

【請求項7】固相化されている高分子の微粒子の材質と粒径、自由電子金属微粒子の厚さが領域ごとに異なり、それぞれの前記領域によって修飾されている前記抗体、抗原、一本鎖DNA、レセプタ、リガンド、および酵素の少なくとも一つを含む試薬が異なる請求項1ないし3のいずれかに記載の生化学センサ。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、複数の抗体、抗原、一本鎖DNA、レセプタ、リガンド、酵素などの生

化学的試薬で修飾された領域を有する生化学センサチップに関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来の技術としては、DNAチップが挙げられる。図2に示す様に、シリコン、ガラスなどの基板30の上に、光リソグラフィと光化学反応の技術を利用することにより、多数の複数領域に異なる数10merのDNAが結合されている。例えば、第1の領域31には第1のDNA32が結合され、また第2の領域33には第2のDNA34が結合されている。検出にあたっては、被検体である遺伝子を数10merの短い断片にし、それぞれを蛍光色素で修飾してから、被検体の試料をDNAチップの表面に加える。DNAチップ上に合成されているDNAと相補的關係にあるDNA断片が試料のなかに存在すると、それらの断片が結合される。例えば、DNA34に相補的關係にあるDNA断片35は、DNA34に結合する。結合しない他のDNA断片を洗い流した後、共焦点顕微鏡36などの高感度光検出方法によりDNAチップを観測すると、特定領域に結合したDNA断片35に結合されている蛍光色素37からの蛍光信号38が検出される。領域ごとに結合されているDNAはあらかじめ決められているため、信号が検出された領域からDNAの断片が同定される。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】上記従来技術においては、膨大な種類のDNAを迅速に検出するのに非常に有利な方法である半面、抗体、抗原、レセプタ、リガンドなどの他の生体分子の検出には容易に利用できない。

【0004】また、試料中のDNA断片を蛍光色素で修飾し、信号を検出するのに共焦点顕微鏡など比較的複雑な光学系が必要であるため、安価な装置とはなり難い。

【0005】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するために、センサチップの作成は、前記生体分子で修飾されたポリスチレン微粒子を金基板の上に表面化学的なパターンニング方法を利用するものである。

【0006】また検出方法については、発明者らが最近発見した金薄膜と金微粒子の表面プラズモンの相互作用に由来すると考えられる発色現象を利用するものである。

【0007】

【発明の実施の形態】DNA、抗体、抗原、レセプタ、リガンド、酵素などの生体分子で既に修飾された高分子微小球または金微粒子を、基板の上に配置することを提案する。基本原理としては、ポリスチレン微粒子に関しては最近発見された次の現象を用いる。1から50mMのカルボジイミド液に懸濁された粒径5 nmから100 μ mのポリスチレン微小球を前記金薄膜に加えると、1層以下の微粒子が金薄膜表面に形成される。したがって、ポリスチレン微小球のパターンニングを行うには、

基板の上に形成された金パターンの上に微粒子を選択的に吸着させたり、または均一な金薄膜上にチオール分子のパターンをリソグラフィーの技術により形成し、ポリスチレン微粒子を前記パターンの上に吸着させたり、もしくは前記パターンの上による吸着を阻止することにより、ポリスチレンの微粒子を基板の上に配置することが可能となる。チオール分子のパターニングに関しては、光照射を利用した方法（ラングミュア10(1984年)第626頁から628頁(Langmuir 10(1984)pp626-628)）、またはゴムのスタンプを利用した方法（サイエンス264(1994年)第696頁から698頁(Science 264(1994)pp696-698)）が知られている。パターン化されたポリスチレン微粒子の一例を、図3の走査型電子顕微鏡写真で示す。一辺が400nmの六角形の穴が規則正しく形成された金属メッシュをポリスチレン基板の上に置き、金を厚さ20nm蒸着することにより、六角形の金パターンを形成した。1から50mMのカルボジイミド液に懸濁された粒径110nmの微粒子を金パターンに加えることにより、金パターンの上のみにポリスチレン微粒子が吸着し、図3では白く見える。

【0008】貴金属微粒子を吸着するにあたっては次の方法を利用する。基板の上に金薄膜を蒸着により形成する。アミノ基を有するアルカンチオール分子の懸濁液を金薄膜表面に添加すると、金薄膜表面にアルカンチオール分子の単分子層が形成される。次にカルボキシル基を有するアルカンチオール分子の懸濁液に1から50mMのカルボジイミド液を加え、前記金薄膜表面に添加することにより、スルフヒドリル基で修飾された金薄膜を得ることができる（ラングミュア13(1997年)第1865頁から1868頁(Langmuir 13(1997)pp1865-1868)）。前記スルフヒドリル基は貴金属微粒子を容易に吸着する。したがって、貴金属微小球のパターニングを行うには、基板の上に形成された金パターンを上記の方法によりスルフヒドリル基で修飾後、貴金属微粒子を選択的に吸着させたり、または均一な金薄膜上にチオール分子のパターンを上記のリソグラフィーの技術により形成し、貴金属微小球を前記パターンの上に吸着することによっても可能となる。金薄膜上に金コロイドを吸着したサンプルを図4に示す。粒径5ミクロンのポリスチレン微粒子を、ポリスチレン基板の上に規則正しくならべ、上から金を蒸着すると、一辺が2ミクロンの三角形の金パターンが形成された。この金パターンを上記の方法によりスルフヒドリル基で修飾してから、粒径100nmの金コロイド液を加えると、金コロイドが金パターンの上に選択的に吸着したことが分かる。

【0009】また、生体分子の吸着を簡便に検出するために、金属薄膜上に形成された金属微粒子の光学特性に関して、最近発見された次の現象を用いる。基板の上に固相化されたポリスチレン微粒子の上に、金を厚さ5nmから500nm蒸着すると、ポリスチレン微粒子の上

に帽子状の金微粒子が形成される（特願平9-148935）。金微粒子が形成されたことにより、基板が顕著な発色を示す様になる（特願平9-148941）。この発色現象は、白色光が基板に対して一定角度で照射され基板表面において反射される際に、一部の波長帯域の光が吸収されることにより生じる半面、透過光に対しては波長依存性がないため発色特性は観察されない。また、反射スペクトルの吸収極大波長は、金微粒子表面上の100nm以下の領域内の屈折率に依存してシフトすることから、敏感なセンサとして用いることができる。

【0010】この発色現象は、金薄膜と金微粒子の表面プラズモンの相互作用に由来すると考えられる。通常の真球状金微粒子を白色光で照射すると、微粒子中の自由電子の集団的振動である表面プラズモンが励起される。金薄膜における表面プラズモンとは異なる分散関係を有し、伝播しないことから局所的表面プラズモンと呼ばれる。共鳴波長は、微粒子の粒径と形状に依存し（サーフェイス・サイエンス156(1985年)第678頁から700頁(Surface Science 156(1985)pp 678-700)）、さらに金微粒子を金薄膜の近傍に形成すると、薄膜の表面プラズモンと微粒子の局所的表面プラズモンが相互作用を及ぼすこととなり、金微粒子と金薄膜の複合体として新たな吸収特性を有することになる。平行化された白色光を一定角度で照射し、反射光を測定することにより得られた反射スペクトルは紫外、可視光、赤外波長の範囲において顕著な吸収ピークを有し、前記吸収ピークの波長は、基板上の金属の種類と厚さ、ポリスチレン微小球の粒径と吸着密度、ポリスチレン微小球の上に蒸着される金属の種類と厚さに顕著に依存する。例えば、粒径が55, 110, 152, 209nmのポリスチレン微粒子に対して、金を厚さ20nm蒸着すると、図5に示す反射スペクトルを有する試料が得られる。

【0011】孤立した微粒子の吸収スペクトルが、界面から粒径の数分の一以内の領域における誘電率に依存することは公知である。さて本特許においては金微粒子が金薄膜上に固相化されていて、金微粒子の局所的表面プラズモンと金薄膜の表面プラズモンが相互作用することから、微粒子と薄膜の間に入射光に比べて数桁強力な電場が存在する。増大電場中において誘電率が変化することにより、吸収スペクトルが大きく変化する。一例として、空気中におけるスペクトルと水中におけるスペクトルを図6に示す。粒径209nmのポリスチレン微小球に、厚さ20nmに金を蒸着した試料において、空気とは異なる誘電率を有する水で表面領域を置換することにより、吸収極大値が波長800nmから870nmに移動するのが分かる。ちなみに、スペクトルの変化は迅速および可逆的であり、表面から数nmから数100nmにおける領域における誘電率の変化に依存する。

【0012】したがって、基板の表面上を複数の領域に分割し、それぞれの領域に異なった抗体、抗原、一本鎖

DNA、レセプタ、リガンドなどの生体分子を吸着させると、結合が生じた領域においてのみある特定波長における反射率が変化するため、蛍光色素を用いることなく吸着を検出することが可能になる。

【0013】実施例1

本発明の生化学センサの一実施例を図1に示す。基板1が複数の領域に分割されており、それぞれの領域では異なる生体分子で修飾されているポリスチレン微粒子が一層吸着されている。例えば領域2に吸着しているポリスチレン微粒子3は抗体4で修飾されており、領域5に吸着しているポリスチレン微粒子6は抗体7で修飾されている。

【0014】被検体を検出するには、サンプル中に存在する被検体を予め蛍光色素で修飾しておく。サンプルを基板1に加えると抗体4に対して特異的結合能を有する被検体である蛋白質8がポリスチレン微粒子3に吸着し、蛍光色素9が領域2に結合する。もしくは、抗体7に対して特異的結合能を有する被検体である抗原10が、前記抗体7との結合によりポリスチレン微粒子6に結合した際、蛍光色素11により修飾されてかつ前記抗原に対する結合能を有する二次抗体12を加えることにより、蛍光色素11が領域5に結合する。

【0015】被検体の結合終了後、基板1を光源13からの励起光14を光学系15により照射する。この照射により、前記蛍光色素9もしくは前記蛍光色素11が励起され、蛍光信号を発するから、これを光学系16により集光し、カメラ17でモニタする。蛍光の波長、もしくは蛍光を発する領域を判別することにより、前記サンプル中の被検体の存在を判別できる。

【0016】基板1への微粒子の吸着の方法の一例を図7に示す。表面に金薄膜が蒸着により形成されている基板1を用意する(a)。次にこの基板1の上に複数の仕切りが形成されたテンプレート40を置く(b)。次いで、それぞれの仕切りの中に、濃度1から100mMのカルボジイミド液に懸濁されたポリスチレン微粒子を流し込む(c)。このとき、テンプレート40の基板1と接する面の隙間から懸濁液が流出する様子を図7(c)の右側に示す。かくして、領域ごとに異なるポリスチレン微粒子を一層吸着した基板を形成することができる(d)。

【0017】実施例2

本発明の他の実施例を示す。ポリスチレン微粒子をフォトリソグラフィによりパターンニングする方法の原理を図8で示す。基板50の表面に形成されている金薄膜51に、アルカンチオール分子の溶液を加えることにより、前記金薄膜51の表面にアルカンチオール分子52が自己組織化してアルカンチオール分子の単層膜53が形成される様子を図8(a)で示す。アルカンチオール分子の単層膜53は一部を拡大して示すように、末端部位Y55を持つアルキル鎖X54が並列したものとなる

が、金薄膜の表面特性は、アルカンチオール分子52のアルキル鎖X54の長さ、および末端部位Y55の電荷、親疎水性により大きく影響を受ける。

【0018】自己組織化したアルカンチオールは紫外線の照射により、金表面から剥離することが知られている。そこで、図8(b)に示す様に、アルカンチオール分子の単層膜53を部分的に紫外線56で照射することにより、単層膜53を除去して、金薄膜51を部分的に露出できる。次に図8(c)に示す様に、濃度1から50mMのカルボジイミド液に懸濁されたポリスチレン微粒子57を金基板に加えることにより、図8(d)に示される様に金薄膜が露出された領域のみに、ポリスチレン微粒子の単層58が形成される。

【0019】さて、上記の吸着原理に基づくポリスチレン微粒子のパターンニング方法を図9に示す。金薄膜60が表面に形成されている基板59を用意する。次いで、金薄膜60の表面へのポリスチレン微粒子の吸着を阻止するため、前記金薄膜60表面をアルカンチオール分子61で修飾する(a)。次に、基板60の特定領域のみにおいてポリスチレン微粒子を吸着するために、光源62から照射される紫外線63を光学系64、マスク65および光学系66を介して表面をアルカンチオール分子で修飾された基板59の表面に照射する。紫外線照射された領域67からはアルカンチオール分子が剥離するため、金薄膜の表面が露出され、カルボジイミド溶液に懸濁されたポリスチレン微粒子68がマスク65のパターン状に吸着する(b)。また、次の段階においては別なマスク69を用いて照射することにより、別な領域70において異なるポリスチレン微粒子71を吸着する(c)。この手順を繰り返して基板60の表面のすべてに所定のポリスチレン微粒子を吸着した基板を形成できる。

【0020】実施例3

本発明の他の実施例を示す。本発明の他の実施例を図10により説明する。平坦なシリコン基板80の上に、まず蒸着により厚さ5nmから1000nmの金薄膜81を形成した。金薄膜の表面を親水性にするために、チオグリコール酸ナトリウムの様にカルボキシル基、または2-アミノエタントールの様にアミノ基を有するアルカンチオール溶液(濃度0.01mMから1M)で金薄膜81を1分以上処理して、アルカンチオール分子層で化学修飾した。次に、濃度1から1Mのカルボジイミド溶液に懸濁された粒径5nmから100μmのポリスチレン微小球82を表面に添加することにより、金薄膜表面にポリスチレン微粒子の層を一層形成した(a)。次に、吸着させたポリスチレン微粒子に金を厚さ5nmから100nm蒸着して金微粒子83を形成した

(b)。金微粒子83が表面に形成されたシリコン基板80は表面プラズモンに由来する現象のため、顕著な発色特性を示す。金微粒子83の表面における屈折率が変

化すると、吸収スペクトルはシフトとする。前記の屈折率変化を生じさせるために、次の方法により金微粒子83の表面近傍に任意の抗原を吸着させる。

【0021】まず金微粒子83の表面を親水性にするために、再びチオグリコール酸ナトリウムの様にカルボキシル基、または2-アミノエタントールの様にアミノ基を有するアルカンチオール溶液（濃度0.01mMから1M）で金微粒子83を1分処理して、チオール分子層で化学修飾した。次に抗体84で修飾されたポリスチレン微粒子85を1から50mMのカルボジイミド溶液に懸濁し加えることにより、ポリスチレン微粒子85を金微粒子83の表面に吸着した（c）。この吸着により金微粒子83の吸収スペクトルはシフトする。さらに抗体84に抗原86が結合すると吸収スペクトルがよりシフトするため、後者のシフトにより、抗体84と抗原86の結合反応を検出することができる。

【0022】本実施例においても、実施例1または実施例2のパターニング方法を利用することにより、シリコン基板80の上に、異なる抗体で修飾されたポリスチレン微粒子を領域ごとに吸着することができ、図1の方法に準じて、シリコン基板80全体を白色光で照射する。各領域から正反射する光のスペクトルを測定することにより、領域ごとに抗原と抗体の吸着を判別することができる。

【0023】実施例4

本発明の他の実施例を示す。フレーム90に保持されたポリエチレンシート91の上に金薄膜92を形成する。前記ポリエチレンシート91の異なる領域に異なるDNAで修飾されたポリスチレン微粒子を結合させるために次の方法を利用する。図11（a）に示す様に、強磁性微粒子93を光ピンセット94で捕獲し、ポリエチレンシート91の下に移動する。次に、DNAで修飾された常磁性ポリスチレン微粒子95をポリエチレンシート91の上から加えると、強磁性微粒子93に引かれ集まる。1から50mMのカルボジイミド溶液を加えることにより、常磁性ポリスチレン微粒子95は金薄膜92の表面に吸着する（b）。次に、強磁性微粒子93を光ピンセットにより異なる領域に移動させ、別なDNAで修飾された常磁性ポリスチレン微粒子96を加えることにより前記強磁性ポリスチレン微粒子94の周辺に集まる。再び1から50mMのカルボジイミド溶液を加えることにより、前記常磁性ポリスチレン微粒子96をポリエチレンシート91の別の領域における金薄膜に吸着することができる（c）。

【0024】この実施例では、磁性粒子毎に常磁性ポリスチレン微粒子を修飾するDNAを独立に制御できるから、狭い領域に多くの被検体対応の修飾領域を形成するのに有利である。

【0025】

【発明の効果】本発明により、被検体の有無を多数、同時に高感度で検出できる簡便なセンサおよび検出装置を提供できた。

【図面の簡単な説明】

【図1】アレー化された微粒子表面における生化学反応を検出する方法を示す図。

【図2】DNAチップにおける検出方法を示す図。

【図3】六角形状の金パターンの上に結合されたポリスチレン微粒子を示す図。

【図4】三角形状の金パターンの上に結合された金微粒子を示す図。

【図5】金微粒子の反射スペクトル。

【図6】誘電率により吸収極大値が変化するスペクトルを示す図。

【図7】テンプレートを利用して、ポリスチレン微粒子をパターン化する方法を示す図。

【図8】フォトリソグラフィーによるパターニング原理を示す図。

【図9】基板の上に微粒子をパターニングする手順を示す図。

【図10】金微粒子の近傍に結合された微粒子を示す図。

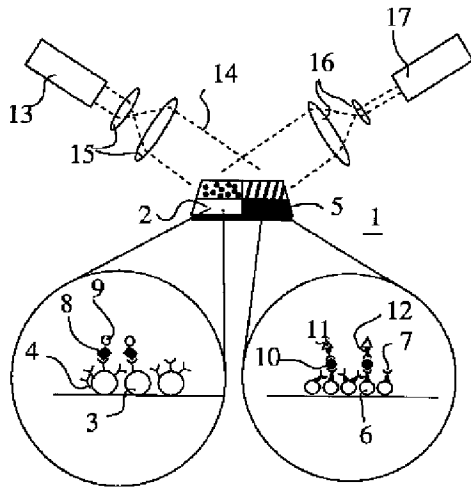
【図11】光ピンセットで操作された強磁性微粒子により、修飾された微粒子をパターニングする方法を示す図。

【符号の説明】

1：基板、2：領域、3：ポリスチレン微粒子、4：抗体、5：領域、6：ポリスチレン微粒子、7：抗体、8：蛋白質、9：蛍光色素、10：抗原、11：蛍光色素、12：二次抗体、13：光源、14：励起光、15：光学系、16：光学系、17：カメラ、30：基板、31：領域、32：DNA、33：領域、34：DNA、35：DNA断片、36：共焦点顕微鏡、37：蛍光色素、38：蛍光信号、40：テンプレート、50：基板、51：金薄膜、52：アルカンチオール分子、53：単層膜、54：アルキル鎖、55：末端部位、56：紫外線、57：ポリスチレン微粒子、58：単層、59：基板、60：金薄膜、61：アルカンチオール分子、62：紫外線の光源、63：紫外線、64：光学系、65：マスク、66：光学系、67：領域、68：ポリスチレン微粒子、69：マスク、70：領域、71：ポリスチレン微粒子、80：シリコン基板、81：金薄膜、82：ポリスチレン微粒子、83：金微粒子、84：抗体、85：ポリスチレン微粒子、86：抗原、90：フレーム、91：ポリエチレンシート、92：強磁性微粒子、93：光ピンセット、94：常磁性ポリスチレン微粒子、95：強磁性微粒子、96：常磁性ポリスチレン微粒子。

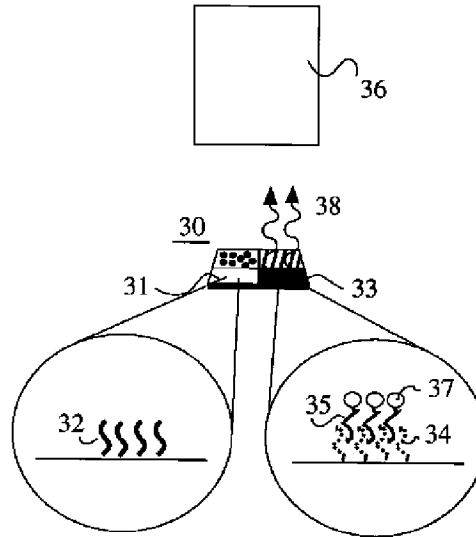
【図1】

図1



【図2】

図2



【図3】

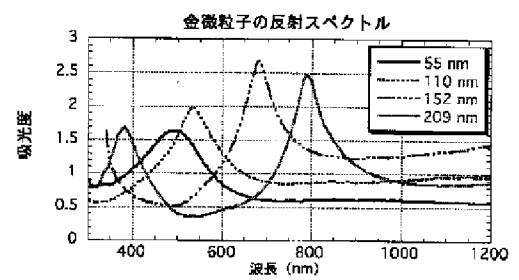
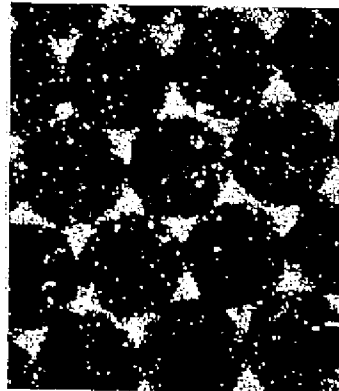
【図4】

【図5】

図3

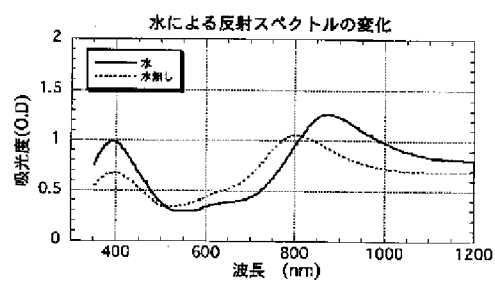
図4

図5



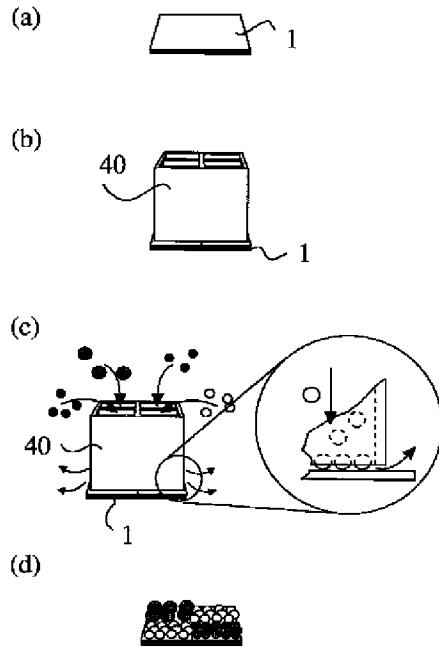
【図6】

図6



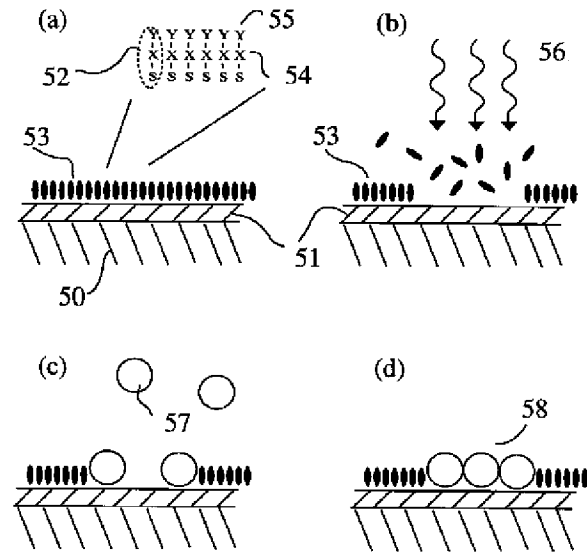
【図7】

図7



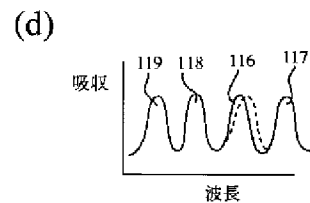
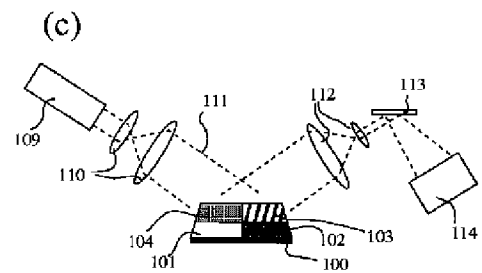
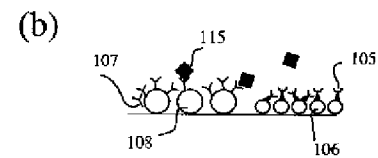
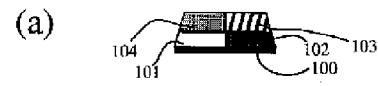
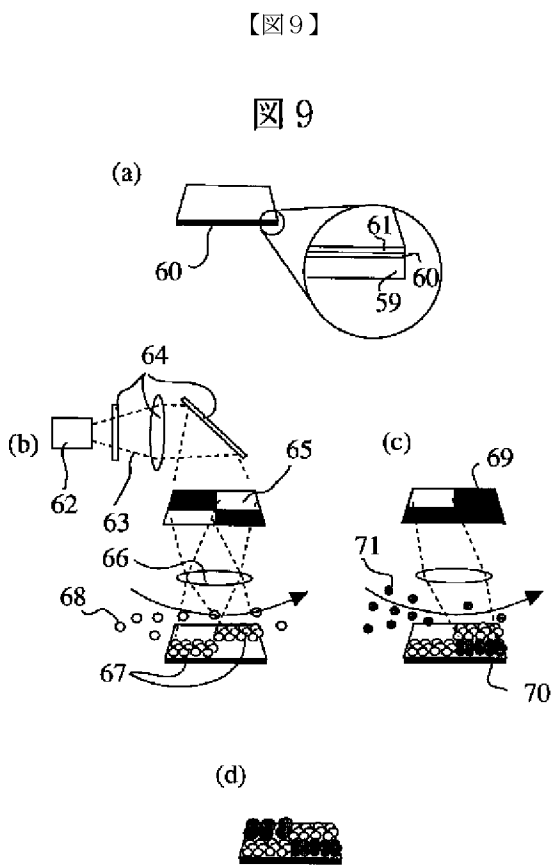
【図8】

図8



【図10】

図10



【図11】

図11

